

HOÀN THIỆN QUY TRÌNH NHÂN NHANH GIỐNG CÂY HOA CÚC (*CHRYSANTHEMUM INDICUM* L.) SẠCH BỆNH BẰNG KỸ THUẬT NUÔI CẤY ĐỈNH SINH TRƯỞNG

NGUYỄN THỊ DIỆU HƯƠNG, DƯƠNG TẤN NHỰT

Phân viện Sinh học tại Đà Lạt

Hoa cúc-*Chrysanthemum indicum* L. thuộc họ Asteraceae đang là một trong những loại hoa được ưa chuộng vì sự đa dạng về chủng loại, màu sắc và hình dáng cũng như độ bền của hoa. Hoa cúc, có nguồn gốc từ Trung Quốc, Nhật Bản, Hà Lan, Indônêxia, được trồng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, loại hoa này có thời gian sinh trưởng không dài, dễ bị nhiễm các bệnh virút, nấm nên rất dễ thoái hóa. Vì vậy người nông dân cũng như các công ty sản xuất hoa phải thường xuyên thay cây sạch bệnh.

Xuất phát từ những yêu cầu thực tế trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu hoàn thiện quy trình nhân nhanh giống hoa cúc bằng kỹ thuật nuôi cấy đỉnh sinh trưởng *in vitro* và phương pháp khai thác ngọn cúc giai đoạn sau ống nghiệm nhằm phục vụ nhu cầu trồng và kinh doanh cây giống của người trồng hoa.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Đỉnh sinh trưởng được tách từ các chồi non của cây mẹ sạch bệnh. Chồi được lột sạch các lá ngoài và rửa dưới vòi nước chảy trong 30 phút, rửa với xà phòng Daso trong 5 phút, sau đó rửa sạch lại dưới vòi nước máy, xử lý sơ bộ bằng cồn 70° trong 30 giây. Tiếp tục, mẫu được khử trùng bằng HgCl₂ ở nồng độ 0,1% với thời gian 7-8 phút và được rửa sạch bằng nước cất vô trùng nhiều lần trong điều kiện vô trùng. Đỉnh sinh trưởng được tách dưới kính lúp có kích thước từ 0,8-1 mm, được sử dụng làm mẫu cấy ban đầu.

2. Môi trường nuôi cấy

Đỉnh sinh trưởng được cấy trên môi trường 1/2 MS (Murashige and Skoog, 1962) có chứa

30 g/l đường, 0,2 mg/l BAP và 8 g/l agar; 15 ml môi trường được rót vào ống nghiệm (25×100 mm) và được đậy bằng nút bông (bảng 1).

Những đốt thân tách từ thân chính tạo từ đỉnh sinh trưởng được cấy lên môi trường 1/2 MS có chứa 30 g/l đường, 8 g/l agar và bổ sung BAP kết hợp với NAA, IAA, IBA theo sự biến thiên của hai yếu tố kích thích sinh trưởng để tìm ra môi trường thích hợp cho việc tạo cụm chồi (bảng 2).

Sau khi tạo được số chồi theo mong muốn, các chồi này được tách rời ra và cấy lên môi trường 1/2 MS có chứa 20 g/l đường, 7 g/l agar và IBA, NAA, IAA (bảng 3).

3. Điều kiện nuôi cấy

Tất cả các thí nghiệm tạo cụm chồi và tạo rễ được nuôi cấy trong bình tam giác 350 ml trong khi đó mẫu chồi đỉnh được cấy vào ống nghiệm (25 X 150 mm). Tất cả các môi trường nuôi cấy được điều chỉnh độ pH bằng 5,8 trước khi tiệt trùng, môi trường được khử trùng ở 121°C và 1 atm. Mẫu được nuôi ở nhiệt độ 25±1°C và cường độ chiếu sáng là 40 μmolm⁻² s⁻¹.

Mỗi thí nghiệm gồm 20 mẫu được sử dụng và lặp lại 3 lần; lấy số liệu chồi sau 30 ngày nuôi cấy; lấy số liệu rễ sau 20 ngày nuôi cấy.

4. Chăm sóc cây mô và khai thác ngọn

Cây mô có bộ rễ phát triển được trồng trong các vỉ xốp chứa đất mùn trộn với phân N:P:K (10:10:10), các vỉ này được giữ ẩm bằng cách phun sương hàng ngày trong nhà kính có nhiệt độ từ 25-27°C, độ ẩm tương đối 80-85% dưới ánh sáng tự nhiên (bảng 4).

Sau 30 ngày nuôi trong vỉ xốp, cây con được chuyển ra trồng ngoài đồng ruộng để khai thác

ngọn. Sử dụng các loại phân bón khác nhau [N:P:K = 15:5:20 (Behn Meyer, Đức) ở nồng độ 0,1%; N:P:K = 10:8:8 (Cropmaster, Mỹ) ở nồng độ 0,2%; N:P:K = 30:10:10 (Grow more) ở nồng độ 0,1%] phun cho cây, mỗi tuần 1 lần (bảng 5).

Mỗi lô thí nghiệm thực hiện trên 100 cây, lặp lại 3 lần để thu kết quả.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mẫu cây tách từ chồi ngọn của cây hoa cúc được đặt trên môi trường MS cải biên có bổ sung BAP ở các nồng độ khác nhau để theo dõi khả năng bật chồi. Tỷ lệ sống sót của mẫu cây đạt 70% (số liệu không chỉ ra), trong khi đó lượng mẫu sống sót có khả năng bật chồi đạt 100% trên môi trường MS cải biên có bổ sung 0,2-0,3 mg/l BAP; ngược lại, không có sự hình thành chồi từ mẫu cây trên môi trường không có BAP. Trên môi trường nuôi cấy có chứa BAP, tất cả các mẫu cây đều tái sinh chồi. Số chồi tái sinh cao nhất trên môi trường có bổ sung 0,2 mg/l BAP. Các mẫu chồi tạo ra được sử dụng làm nguyên liệu cho việc nhân chồi (bảng 1).

Tách các thân đốt và chồi đỉnh tạo ra từ chồi tái sinh *in vitro*, tiếp tục cấy chuyển để có được số lượng lớn chồi theo mong muốn. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trên môi trường có chứa BAP với IBA, NAA và IAA, tất cả các mẫu cây đều tái sinh chồi; trên môi trường 1/2 MS có bổ sung 1,0 mg/l BAP, 0,2 mg/l IBA, số lượng chồi tạo ra là lớn nhất, cụm chồi tạo ra khỏe và thấp nhất trên môi trường có 1,0 mg/l BAP và 0,2 mg/l

IAA. Chồi cao nhất trên môi trường có chứa BAP (5-10 mg/l) với 0,2 mg/l NAA và thấp nhất trên môi trường có chứa 1,0 mg/l BAP và 0,2 mg/l IAA.

Bảng 1

Ảnh hưởng của BAP đến khả năng bật chồi của đỉnh sinh trưởng của cây hoa cúc

BAP (mg/l)	Tỷ lệ bật chồi (%)	Số lượng chồi tạo thành/1 mẫu
0,0	0,0	0,0
0,1	94	2,1
0,2	100	3,1
0,3	100	2,7
0,4	92	2,2

Các cụm chồi *in vitro* được tách rời ra thành từng chồi riêng biệt và cấy chuyển lên môi trường ra rễ. Kết quả ở bảng 3 cho thấy cả NAA và IBA đều giúp tạo rễ tốt, trong khi dùng IAA cho kết quả kém hơn.

Các cây hoa cúc *in vitro* cao từ 2,5-3 cm, có đủ thân, lá, rễ, khỏe mạnh được rút ra khỏi ống nghiệm, rửa sạch agar (thạch) bám quanh gốc và trồng trên giá thể là đất mùn với độ pH bằng 5,8-6,5; EC = 0,5-0,8. Khi trồng, gốc cây ngập sâu trong giá thể 0,5-1,0 cm. Cây được tưới giữ ẩm 2-4 lần/ngày tùy điều kiện thời tiết và giảm thiểu khả năng mất nước trong điều kiện nhà kính. Sau 30 ngày chăm sóc, tỷ lệ cây con sống sót đạt 95% (bảng 4).

Bảng 2

Ảnh hưởng của BAP, NAA, IAA, IBA đến khả năng tạo cụm chồi của cây hoa cúc

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)				Số lượng chồi trên 1 mẫu (cm)	Chiều cao trung bình của chồi cây (cm)
BAP	IBA	NAA	IAA		
0,5	0,2			6,6	1,5
1,0	0,2			7,1	1,7
0,5		0,2		5,6	2,5
1,0		0,2		6,7	2,8
0,5			0,2	6,2	1,7
1,0			0,2	5,3	1,0

Ảnh hưởng của NAA, IBA và IAA đến khả năng sinh trưởng và ra rễ của chồi của cây hoa cúc

Chất kích thích sinh trưởng (mg/l)			Số lượng rễ trên 1 mẫu (cm)	Chiều cao trung bình của cây (cm)
NAA	IBA	IAA		
0,2			5,6	2,4
0,3			6,9	2,5
0,4			7,6	2,6
0,5			7,1	2,2
	0,2		6,6	2,2
	0,3		7,8	2,4
	0,4		8,6	2,3
	0,5		7,4	2,9
		0,2	3,7	2,8
		0,3	5,2	2,7
		0,4	4,6	2,5
		0,5	4,3	2,0

Bảng 4

Khả năng sinh trưởng của cây hoa cúc ở giai đoạn vườn ươm

Thời gian (ngày)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao trung bình của cây (cm)	Số lá trung bình của cây
10	99	2,8	5,8
20	96	3,4	6,2
30	95	4,2	7,8

Sau 30 ngày ở giai đoạn vườn ươm, cây đã khỏe mạnh, thích nghi tốt với điều kiện bên ngoài, có bộ rễ phát triển và ra thêm lá mới; cây được chuyển ra trồng ngoài đồng ruộng. Đất trồng hoa cúc nên được bổ sung phân chuồng hoai, phân N:P:K = 16:16:8 (phân Đâu Trâu-Bình Điền) và vôi sao cho độ pH đạt 5,5-6,5, EC = 0,8-1,2. Phun thuốc trừ nấm, sâu bệnh định kỳ 1 tuần hai lần. Sau khi trồng 10 ngày, bắt đầu bấm ngọn. Hàng tuần, phun phân qua lá cho cây, phân Grow more cho kết quả cao nhất. Lượng ngọn thu được hàng tuần trung bình đạt 2,4/gốc. Thời gian bắt đầu thu ngọn cũng nhanh hơn. Chồi non phát triển xanh, khoẻ và đồng

đều; được bón phân supe, cây có chiều cao lớn hơn so với việc bón nitrophotka và phân Grow more nhưng cây có ít nhánh hơn, đốt thân dài, ngọn ốm hơn.

Bảng 5

Ảnh hưởng của phân bón lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây hoa cúc

Loại phân bón	Chiều cao của ngọn (cm)	Số ngọn cúc thu được/tuần/cây
Grow more	7,8	3,4
Supe	8,4	3,2
Nitrophotka	7,2	2,8

Sau khi cắt ngọn, có thể dùng IBA hoặc NAA ở nồng độ từ 500-1000 ppm để xử lý ngọn ra rễ. Sau khoảng 15 ngày, ngọn giâm có thể xuất ra đồng ruộng (không đưa số liệu vào bài). Khai thác ngọn từ 15-20 ngọn/gốc nên trồng thay cây mô, lại để ngọn hoa cúc luôn trẻ hóa.

III. KẾT LUẬN

Bằng công nghệ nuôi cấy dinh dưỡng sinh trưởng,

chúng tôi đã hoàn thiện quy trình nhân nhanh giống cây hoa cúc. Tỷ lệ cây sống sau ống nghiệm đạt cao. Cây đảm bảo sạch bệnh, trẻ hóa và có chất lượng tốt.

Dùng phân Grow more phun hàng tuần cho ngọn khỏe và có nhiều ngọn/gốc.

Phương pháp này cho phép nhân nhanh một

số lượng lớn cây giống đồng nhất với giá thành hạ, có thể cung cấp cây giống cho các nhà trồng hoa thương mại phát triển trên diện rộng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Murashige T. and Skoog F., 1962: *Physiol. Plant*, 15: 473-479.

RAPID PROPAGATION OF *CHRYSANTHEMUM INDICUM* L. BY MERISTEM CULTURE

NGUYEN THI DIEU HUONG, DUONG TAN NHUT

SUMMARY

A protocol for the rapid propagation of *Chrysanthemum indicum* L. (Asteraceae) using shoots derived from the *in vitro* meristem culture was developed. The meristem from the shoot tip was cultured on the modified MS (Murashige and Skoog, 1962) medium. Shoots were formed after 30 days culture. An average of 8 shoots were formed on all nodes of the plantlet. For the multiplication and proliferation of the shoots, single shoot was isolated and cultured on the one-half MS medium supplemented with 1.0 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA or IBA, 8 g/l agar, 30 g/l sucrose and pH = 5.7-5.8. The shoots were rooted on the modified MS medium containing 0.4 mg/l NAA or 0.4 mg/l IBA. 95% plantlets were survived after the transferring in the greenhouse. Spit the Grow more manure 0.1% one time per week for the plantlets to improve the quality of the shoot *ex vitro*.

This method can be used for the micropropagation of many species of the genus *Chrysanthemum* L. newly imported, with great numbers of the rejuvenescent and free-virus plants at a low-price.

Ngày nhận bài: 17-12-2003